1PD041

神経細胞膜における、ニューロピリン-1 と脂質分子の運動の制御機構: 一粒子追跡法と光ピンセット法による研究
 ○中田千枝子¹、平田たつみ²、川崎能彦¹、山口和彦³、藤澤肇¹、楠見明弘^{1,4} (¹名大院理生命理学、²遺伝研、³理研脳科学総合研究センター、⁴ERATO, JST)

ニューロピリン-1 は神経回路発達時に発現する神経特異的膜タンパク質 (一回膜貫通型) で、細胞間接着活性をもち、また軸索誘導阻害因子セマフォリンのレセプターでもある。我々はニューロピリンの細胞膜上での運動と局在が、生後の海馬の発達とともにどのように変化していくかを検討している。本発表では、ラット新生児海馬から取り出した、培養後 0-2 日目の初代培養細胞での結果を報告する。直径 40 nm の金コロイド粒子をニューロピリンに結合させ、一粒子追跡法と光ピンセット法を用いて一分子レベルで検討した。拡散係数は 7 ミリ秒と 100 ミリ秒の時間スケールで見て、ともに $2.3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ であった。この値は細胞膜中での膜タンパク質としては最も早い部類に属するが、再構成膜中の膜タンパク質の運動に比べると、1/10 程度である。光ピンセットを用いてニューロピリンを 0.6 $\mu\text{m/s}$ で牽引すると、ニューロピリンは細胞膜内から平均 0.034 pN という弱い力を受けた。同じ細胞において脂質分子を同様に観察したが、類似した挙動を示した。ニューロピリンの細胞膜中での運動は、他の膜タンパク質 (特に止まっている膜タンパク質) の存在による、流体力学的効果およびパーコレーション効果によるものであることが示唆された。

C. Nakada, T. Hirata, T. Kawasaki, K. Yamaguchi, H. Fujisawa, A. Kusumi: Hampered diffusion of neuropilin-1 and lipids in the plasma membrane of hippocampal neurons as studied by single particle tracking and optical tweezers.

1PD043

センダイウイルス・リポソーム複合体の電子顕微鏡観察
 ○今井正樹、周 徳山、川崎一則 (工技院・生命研)

エンベロープ・ウイルスの膜融合は生物学的膜融合の代表的モデル系として注目されてきた。中でもインフルエンザウイルスの膜融合分子機構は近年数多くの研究によって著しく理解が進み、このウイルスとリポソームの間に生じる膜融合中間体の微小形態も明らかにされている (T. Kanaseki et al., J. Cell Biol., 137, 1041, 1997.)。今回我々は、やはり代表的な膜融合性ウイルスの一つであるセンダイウイルスの膜融合過程を解析するために、センダイウイルスとリポソームの複合体の形態を電子顕微鏡によって観察した。インフルエンザウイルスの膜融合は弱酸性で生じセンダイウイルスの膜融合は中性で生じるという相違があるものの、両者には共通する機構があると考えられ、それはさらに一般的な生物学的膜融合の機構にもなっているであろうと期待されている。

リポソームは、ウイルス・レセプターであるガングリオシド GD1a を含むものを作製した。超音波処理によってフォスファチジル・コリン: コレステロール: GD1a = 1 : 0.34 : 0.09 (モル比) からなる小型リポソーム (脂質濃度 20 mg/ml) を調製し、これに等量の飽和 KCl 溶液を加え 3 回の凍結融解をし、PBS に対して 2 日間透析することによって大型リポソームを作製した。センダイウイルスとリポソームを 4℃ で混合、30 分間静置した後にネガティブ染色像を観察すると、センダイウイルスとリポソームの様々な大きさの複合体が観察された。ウイルスと結合したリポソームの直径は 100 nm 程度から大きなもので 1 μm 程度であった。リポソームだけをネガティブ染色したときには直径が数十~200 nm 程度のものばかりが観察された。これらの結果から、ウイルスとの結合にはリポソームを染色・乾燥による分裂や変形から保護する作用があると考えられた。現在、このウイルス・リポソーム複合体に生じる膜融合過程の形態観察を行っている。

Masaki Imai, Deshan Zhou, Kazunori Kawasaki: Electron microscopic observation of Sendai virus-liposome complex.

1PD042

細胞膜におけるリン脂質のコンパートメント化された運動: アンカード膜タンパク質ピケットモデル
 ○藤原敬宏¹・楠見明弘^{1,2} (ERATO・JST、²名大院・生命理学)

培養繊維芽細胞 (NRK) の細胞膜上でリン脂質の運動を 1 分子レベルで追跡した。細胞膜にフルオレセイン標識した不飽和 (DOPE)、または、飽和 PE (DPPE) を導入し、これに抗フルオレセイン抗体 Fab 断片を介して金コロイドを結合させ、その光学顕微鏡像を高速カメラで観察した。

DOPE と DPPE の運動はほとんど同じであり、DIG ドメイン (raft) らしいものは確認できなかった (PE がドメインに入ったとしても滞在時間は数 10 ms 以下)。2 ms の時間分解能で得た約 10 秒間の DOPE の軌跡は、目視によってわかるようなコンパートメント化された運動をはっきり示しており、コンパートメント間のホップの頻度は平均約 1 秒に 1 回であった。コンパートメントの大きさは約 700 nm であり、これは軌跡の定量的解析によって得られた値と一致している。アクチン線維を安定化する薬剤 (jasplakinolide) で細胞を処理したところ、コンパートメント内の滞在時間が約 2 倍 (2 秒) 長くなり、脱重合する薬剤 (swinholid) で処理したところ、制限範囲が約 1.5 倍 (1100 nm) 大きくなった。

一方、膜貫通型タンパク質であるトランスフェリン受容体も、主にアクチン線維で形成される膜骨格のフェンス構造と直接ぶつかることによって、ほぼ同じサイズ (500 nm) の範囲に運動を制限されていた。以上のリン脂質の結果は、「膜骨格アンカーされた膜貫通型タンパク質群が、ピケラインのようになってリン脂質の運動を抑制している」というモデル (膜骨格結合タンパク質ピケットモデル) によって説明できる。

T. Fujiwara, A. Kusumi: Compartmentalized movement of phospholipids in the plasma membrane: anchored-protein picket model.

1PD044

インフルエンザ・ウイルスと赤血球ゴースト膜の間に生じる吸着膜融合部位の電子顕微鏡観察
 ○周 徳山、今井正樹、川崎一則 (工技院・生命研)

インフルエンザウイルスの膜タンパク質ヘマグルチニンは細胞表面レセプターへの結合と低 pH 依存的な膜融合の活性を有している。我々はヘマグルチニンの機能の分子機構を解明するために、インフルエンザ・ウイルスと赤血球ゴースト膜の間に生じる膜融合の急速凍結レプリカ法による形態的な解析を行っている。

ウイルス粒子とゴースト膜をまず 4℃、pH 7.4 で 15 分間結合させ、次に膜融合が誘起される条件である 25℃、pH 5.2 で 45~90 秒間の酸性処理をした後、試料をメタル・コンタクト法で急速凍結し、凍結断白金レプリカを作製して電子顕微鏡観察を行った。ゴースト膜の切断凸面 (P 面) にはウイルス粒子と同程度の直径 (100-200 nm) の窪みが多数観察され、切断凹面 (E 面) には同サイズの膨らみが観察された。これらはウイルスの吸着で生じたゴースト膜の内側への陥入部であると考えられる。実際ゴースト膜切断凸面の窪みの中にはウイルス膜の切断凸面や凹面が観察された。一方、ゴースト膜切断凹面の膨らみには切断によって穴が開けられる場合があるが、その穴の中にはウイルス膜の切断凸面または凹面が観察された。このようなゴースト膜上のウイルス吸着部位を詳細に観察したところ、ウイルス膜とゴースト膜をつなぐ径 10-20 nm 程度の細い結合部が見出された。また、ゴースト膜の切断凸面の窪みにも凹面の膨らみにも直径数十 nm の孔が形成されることが判明した。これらの構造は膜融合中間体である膜融合頸部と膜融合孔であると考えられる。

我々が今回観察した細い結合部や小さな孔は、既にインフルエンザ・ウイルスとリポソームの膜融合の急速凍結レプリカ法による観察 [Kanaseki et al., 1997, J. Cell Biol., vol. 137, 1041-1056] で膜融合の中間体として明らかにされている「膜の微小隆起」に相当する可能性がある。

Deshan Zhou, Masaki Imai, Kazunori Kawasaki: EM Observation of Contact and Fusion Sites between Influenza Virus and Red Blood Cell Ghost Membrane.